

IVELONE MARIA DE CARVALHO LOPES

“ESTUDO QUÍMICO DE *Erythroxylum suberosum*, BIOMONITORADO POR
INIBIÇÃO DA HIALURONIDASE”

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

IVELONE MARIA DE CARVALHO LOPES

**“ESTUDO QUÍMICO DE *Erythroxylum suberosum*, BIOMONITORADO POR
INIBIÇÃO DA HIALURONIDASE”**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do
Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília.

Orientadora: Dâmaris Silveira

Co-Orientadora: Pérola de O. Magalhães

BRASÍLIA
2016

IVELONE MARIA DE CARVALHO LOPES

“ESTUDO QUÍMICO DE *Erythroxylum suberosum*, BIOMONITORADO POR
INIBIÇÃO DA HIALURONIDASE”

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do Título
de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília.

Aprovado em ____ de _____ de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Dâmaris Silveira (presidente)
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Yris Maria Fonseca Bazzo
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Prof. Dr. Luis Alberto Simeoni
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Yanna Karla de M Nóbrega
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Prof.^a Dr.^a Claudia Masrouah Jamal
Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo

Dr.^a Paloma Michelle de Sales (suplente)
Laboratório Centra de Saúde Pública, SES-DF

Dedico este trabalho à minha pequena Sofia que veio trazendo alegria e graça para nossas vidas, ao meu amado filho e amigo Rafael e ao meu esposo Janio pelo apoio e compreensão em todo tempo!

AGRADECIMENTOS

À professora Dâmaris Silveira, pela orientação, amizade, aprendizado e estímulo constante, além da compreensão e apoio que me foram extremamente importantes.

À professora Pérola Magalhães pela co-orientação e atenção a mim concedida nos momentos de dúvidas.

Aos professores, Christopher Fagg e Sueli Maria Gomes, pelo empenho e colaboração, principalmente na coleta e identificação das espécies estudadas e fornecimento do material botânico.

À professora Inês Sabioni Resck, Instituto de Química, pelo auxílio na execução dos ensaios de RMN e pela atenção a mim concedida.

Aos professores Luiz Alberto Simeoni e Yris Fonseca pelos ensinamentos, apoio, amizade e colaboração.

Aos alunos de iniciação científica Thais Leite Viana, Caio Fernandes M. Leite e Bruno Henrique M. Leite pela colaboração na parte experimental deste trabalho, pela dedicação e compromisso.

A todos os servidores que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto, em especial para Patrícia Marques pela colaboração e auxílio nas atividades desenvolvidas no LCQ.

Às amigas, Cintia Matos e Paloma Michelle, pela amizade e incentivo construtivo.

Ao meu esposo, Janio Donato, que mais uma vez dispensou toda a sua compreensão, incentivo, dedicação e apoio constantes que me fazem vencer barreiras e ultrapassar obstáculos.

Às minhas irmãs, exemplos para minha vida e eternas incentivadoras.

Aos meus pais (*in memoriam*) pelos princípios e ensinamentos que levo para toda a vida.

A Deus, autor de minha vida e de minha fé, meu refúgio e fortaleza, pela minha vida e por tudo o que sou.

Ao CNPq, FUNPE, FINATEC e FAP-DF pelo suporte financeiro.

*“Pois quando a sabedoria entrar no teu coração e o
conhecimento for agradável a tua alma, o
discernimento te guardará e a inteligência te
preservará”.
Pv 2:10-11*

RESUMO

O Cerrado se constitui em importante centro de biodiversidade abrigando espécies úteis para a medicina popular., entre elas o *Erythroxylum suberosum*, arbusto da família Erythroxylaceae amplamente distribuído no território nacional. Seus frutos servem de alimento para aves, seu tronco é suberoso, sua madeira é utilizada na carpintaria e suas cascas são utilizadas no curtimento de couro. É conhecido como fruta-de-pomba-do-campo, mercureiro, sombra de touro e cabelo de nego, utilizado na medicina popular contra má digestão, reumatismo e inflamação. O presente estudo teve como objetivo realizar estudo químico, de espécie do gênero *Erythroxylum*, biomonitorado por inibição da hialuronidase. No ensaio de inibição enzimática foi utilizado método turbidimétrico, com adaptações. Os compostos foram isolados por CC de Sílica gel ou Sephadex e identificados por CCD, CLAE-DAD, e RMN de ^1H e ^{13}C . O extrato etanólico de *E. suberosum* apresentou forte potencial de inibição com $\text{IC}_{50} = 0,045 \text{ mg/mL}$, significativamente menor que o controle cromoglicato dissódico ($\text{IC}_{50} = 4,8 \text{ mg/mL}$). Do extrato etanólico foram identificados rutina, quercetina e derivados, catequina, epicatequina e derivados do ácido clorogênico e isolada mistura de hiperosídeo e isoquercitrina. Do extrato aquoso foi identificada mistura de frutose e trealose, catequina e epicatequina, e isolada a rutina. Do extrato hexânicos foram isolados ésteres alifáticos de cadeia longa. A atividade dos extratos e frações frente à enzima foi justificada, em parte, pela presença da quercetina ($\text{IC}_{50} = 0,36 \text{ mg/mL}$). A atividade antioxidante observada para os extratos aquoso, etanólico e frações foi relacionada à composição micromolecular dos mesmos. Os extratos brutos de *E. suberosum* não foram citotóxicos frente às larvas de *A. salina* com $\text{DL}_{50} > 1\text{mg/mL}$. Esses resultados revelam o potencial de *E. suberosum* no elenco de espécies brasileiras farmacologicamente úteis. A descoberta de novos inibidores da hialuronidase representam um avanço na terapêutica já que o complexo hialuronano-hialuronidase está envolvido em vários processos fisiopatológicos. Esse foi o primeiro relato, pelo que se sabe, de inibição da hialuronidase pelos extratos e flavonoides isolados das folhas de *E. suberosum*.

Palavras-chave: *Erythroxylum suberosum*; hialuronidase; flavonoides; Cerrado.

ABSTRACT

Cerrado consists in an important center of biodiversity hosting species useful for folk medicine, among which is *Erythroxylum suberosum*, a bush from Erythroxylaceae family, widely spread throughout the national territory. Its fruits serve as food to birds; its trunk is suberous, its wood is used in carpentry, and its barks are used in leather tanning. It is well known as *fruta-de-pomba-do-campo*, *mercureiro*, *sombra de touro* and *cabelo de nego*, used in folk medicine against indigestion, rheumatism, and inflammation. The current study aimed to carry out a chemical study of species of *Erythroxylum* genus bioguided by inhibition of hyaluronidase enzyme. In the enzyme inhibition assay was used the turbidimetric method, with adaptations. The compounds were isolated by Sílica gel or Sephadex® CC and identified by TLC, HPLC-DAD, and NMR of ^1H and ^{13}C . The ethanolic extract of *E. suberosum* presented high potential for inhibition with $\text{IC}_{50} = 0,045 \text{ mg/mL}$, significantly less than the disodium cromoglycate control ($\text{IC}_{50} = 4,8 \text{ mg/mL}$). From the ethanolic extract were identified rutin, quercetin, and derivatives, catechin, epicatechin and derivatives of chlorogenic acid; moreover, a mixture of hyperoside and isoquercitrin was isolated from the same extract. Rutin was isolated from aqueous extract, as well as were identified a mixture of fructose and trehalose, catechin and epicatechin. From the hexane extract were isolated aliphatic esters of long chain. The activity of the extracts and fractions in the enzyme hyaluronidase was justified, in part, due to the presence of quercetin ($\text{IC}_{50} = 0,36 \text{ mg/mL}$). The observed aqueous, and ethanolic extracts and fractions antioxidant activity, by , was associated to the chemical composition of these mixtures. The crude extracts of *E. suberosum* were not cytotoxic to brine shrimp (*A. salina*) with $\text{LD}_{50} > 1 \text{ mg/mL}$. These results show the potential of *E. suberosum* as a pharmacologically useful Brazilian species. The discovery of new hyaluronidase inhibitors represents an advance for the therapeutic, due to the hyaluronan-hyaluronidase complex is involved in several patho-physiological processes. This was the first report, by what is known, about the inhibition of hyaluronidase enzyme by extracts and flavonoids isolated from the leaves of *E. suberosum*.

Keywords: *Erythroxylum suberosum*; hyaluronidase, flavonoids; *Cerrado*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação das hialuronidases segundo Meyer (1971)	30
Figura 2 - Representação esquemática para o processo de obtenção dos extratos brutos de espécies do gênero <i>Erythroxylum</i>	49
Figura 3 - Representação esquemática de partição líquido – líquido do extrato tanólico bruto das folhas de <i>Erythroxylum suberosum</i>	52
Figura 4 - Perfil cromatográfico em CCD para as subfrações de FHM (1 a 18)	53
Figura 5 - Representação esquemática da determinação da atividade de inibição sobre a hialuronidase	59
Figura 6 - IC ₅₀ : ácido elágico, quercetina, ácido rosmarínico; e DSCG frente à hialuronidase	64
Figura 7 - Curvas de dose e resposta para os extratos brutos de <i>Erythroxylum</i> frente à hialuronidase	67
Figura 8 - IC ₅₀ : extratos brutos de <i>Erythroxylum</i> em comparação ao controle DSCG frente à hialuronidase	68
Figura 9 – Inibição (%) da hialuronidase para o extrato etanólico bruto e frações de <i>E. suberosum</i>	69
Figura 10 – Inibição (%) da hialuronidase por subfrações de FHM	69
Figura 11 – IC ₅₀ para ESE02 em comparação com EEESflh, DSCG e Quercetina frente à hialuronidase	71
Figura 12 – Núcleo fundamental dos flavonoides	72
Figura 13 - Perfil cromatográfico (CCD) padrões comerciais, extratos e frações de <i>Erythroxylum suberosum</i>	73
Figura 14 – Cromatograma do extrato etanólico bruto (EEESflh) por CLAE-DAD em 354 nm	75
Figura 15 – Espectros no UV para o pico 1 (tR = 27,12 min) exibidos no cromatograma de EEESflh em 354 nm	75
Figura 16 - Cromatograma do extrato EEESflh em CLAE-DAD (280 nm)	76
Figura 17 - Cromatograma da fração FHM por CLAE-DAD em 280 nm	77
Figura 18 - Cromatograma da fração FHM em 354 nm por CLAE-DAD	78
Figura 19 – Espectros no UV para os picos 1 (tR = 9,15 min), 2 (tR = 14,95 min), 3 (tR = 28,43 min), 4 (tR = 28,96 min) e 5 (tR = 30,84 min) exibidos no cromatograma de FHM em 354 nm	79

Figura 20 - Cromatograma da fração FDCM por CLAE-DAD a 354 nm	80
Figura 21 – Espectros no UV para os picos 6 (tR = 28,43 min), 7 (tR = 29,98 min), 8 (tR = 30,85 min) e 10 (tR = 47,17 min) exibidos no cromatograma da fração FDCM em 354 nm	80
Figura 22 - CCD de ESE02, extratos e frações de <i>Erythroxylum suberosum</i>	81
Figura 23 - Espectro de RMN de ¹ H de ESE 02 (300 MHz, MeOD ₄)	82
Figura 24 - Espectro de RMN de ¹ H de ESE02 - Expansão da região entre δ0 e δ5,8 (300 MHz, MeOD ₄)	82
Figura 25 - Espectro de RMN de ¹ H de ESE02 - Expansão da região entre δ6,2 e δ8,0 (300 MHz, MeOD ₄)	83
Figura 26 - Espectro de RMN de ¹³ C de ESE 02 (75 MHz, MeOD ₄)	83
Figura 27 - Cromatograma de ESE02 por CLAE-DAD em 354 nm	85
Figura 28 – Cromatograma de ESE02 por CLAE-DAD em 354 nm com adição de padrões	85
Figura 29 – Espectros no UV para os picos 1 (tR = 28,43 min), 2 (tR = 29,02 min) e 3 (tR = 30,85 min) exibidos no cromatograma de ESE02 em 354 nm	86
Figura 30 – Espectros no UV para os picos 1 (tR=9,25 min), 2 (tR=14,30 min) e 3 (tR=15,19 min) apresentados nos cromatogramas de FHM3, FHM5, FHM6 e FHM7 por CLAE-DAD a 354 nm	88
Figura 31 – Cromatogramas de FHM3, FHM5, FHM6 e FHM7 por CLAE-DAD a 354 nm	89
Figura 32 – Cromatogramas de FHM5 e FHM por CLAE-DAD	91
Figura 33 – Espectros no UV para os picos 4 (tR = 22,30 min), 5 (tR = 22,62 min), b (tR = 26,70 min) e pico 6 (tR = 27,38 min) apresentados nos cromatogramas de FHM5 e FHM6 em 354 nm	92
Figura 34 – Cromatograma de FHM9 (A) e FHM10 (B) por CLAE – DAD em 354 nm	93
Figura 35 – Espectros no UV para os picos c (tR = 28,74 min), e (tR = 31,17 min), f (tR = 32,07 min) e g (tR = 33,05 min) exibidos nos cromatogramas de FHM9 e FHM10 em 354 nm	94
Figura 36 - Cromatograma de FHM9 por CLAE-DAD em 354 nm coeluído com padrões	95
Figura 37 - Cromatograma de FHM14 por CLAE-DAD em 354 nm	96

Figura 38 – Cromatograma de FHM14 por CLAE_DAD em 354 nm com adição de padrão	96
Figura 39 - Cromatograma do extrato aquoso (EAESflh) por CLAE-IR: mistura frutose (tR = 7,25 min) e trealose (tR = 14,97 min)	99
Figura 40 - Cromatograma do extrato aquoso (EAESflh) por CLAE-DAD em 354nm	100
Figura 41 - Cromatograma do extrato aquoso (EAES) por CLAE-DAD em 280 nm	101
Figura 42 - Espectro de RMN de ^1H de ESE04 - Expansão da região entre δ 1,0 e δ 5,5 (300 MHz, MeOD_4)	102
Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H de ESE04 - Expansão da região entre δ 6,2 e δ 8,2 (300 MHz, MeOD_4)	103
Figura 44 - Espectro de RMN de ^{13}C de ESA04 (75 MHz, MeOD_4)	103
Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H (A) (300 MHz, MeOD_4) e de ^{13}C (B) (75 MHz, MeOD_4) - do padrão rotina ESA04	104
Figura 46 - Espectro de RMN de ^1H de ESH (05, 06, 08, 09 e 13) – Expansão da região entre δ 0,85 e δ 4,1 (300 MHz, CDCl_3)	108
Figura 47 - Espectro de RMN de ^{13}C de ESH (05,06,08, 09 e 13) (75 MHz, CDCl_3)	109
Figura 48 – Características estruturais atribuídas à atividade antioxidante dos flavonoides	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de eluição para análise por CLAE-DAD na detecção de flavonoides	39
Tabela 2 – Dados de coleta, identificação e extração das espécies de <i>Erythroxylum</i>	47
Tabela 3 – Rendimentos dos extratos brutos das partes aéreas de <i>Erythroxylum</i>	48
Tabela 4 - Frações do extrato etanólico de <i>Erythroxylum suberosum</i> – CC - Sílica gel	50
Tabela 5 – Frações de FHM – (CC) Sephadex® LH-20	53
Tabela 6 – Inibição (%) da hialuronidase por compostos fenólicos e DSCG	60
Tabela 7 - Inibição (%) da hialuronidase por extratos brutos de espécies de <i>Erythroxylum</i> , DSCG e quercetina	65
Tabela 8 - Estudo farmacognóstico preliminar (CCD) dos extratos brutos e frações de <i>Erythroxylum suberosum</i>	72
Tabela 9 - Deslocamentos químicos para ESE02 em RMN de ^{13}C (75 MHz, MeOD_4) comparados com os dados da literatura	84
Tabela 10 - Deslocamentos químicos para ESA04 em RMN de ^{13}C (δ , CD_3OD , 75MHz) em comparação com dados da literatura e padrão rotina	104
Tabela 11 - Teor de fenólicos e flavonoides totais nos extratos brutos e frações de <i>Erythroxylum suberosum</i>	110
Tabela 12 - Capacidade antioxidante total dos extratos brutos e frações de <i>Erythroxylum suberosum</i>	112

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ABS Absorbância

AcOEt Acetato de Etila

ACG Ácido Clorogênico

BTH Hialuronidase Testicular Bovina

BSA Soroalbumina bovina

CC Cromatografia em Coluna

CCD Cromatografia em Camada Delgada

CDCl₃ Clorofórmio deuterado

CQA Ácidos Cafeiolquínicos

CFQA Ácidos Cafeiol-feruloilquínicos

IC₅₀ Concentração Inibitória Mediana

CL₅₀ Concentração Letal Mediana

CLAE-DAD Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos

CTAB Brometo de Hexadeciltrimetilamônio

d duplete

dd duplete duplo

DMSO Dimetilsulfóxido

DSCG Cromoglicato dissódico

EAG Equivalentes de ácido gálico

EAESflh Extrato Aquoso Bruto das folhas de *E. suberosum*

ECA Enzima Conversora de Angiotensina

EEESflh Extrato Etanólico Bruto das folhas de *E. suberosum*

EHESflh Extrato Hexânico Bruto das folhas de *E. suberosum*

EQ Equivalentes de Quercetina

FE Fase Estacionária

FDCM Fração Diclorometano

FH Fração Hexânica

FHM Fração Hidrometanólica

FM Fase Móvel

ROS *Reactive Oxygen Species* (Espécie Reativa do Metabolismo do Oxigênio)

EtOH Etanol

HA Ácido Hialurônico

Hex Hexano

HPLC *High-performance liquid chromatography*

ICAM-1 Molécula de adesão intercellular-1

J Constante de acoplamento de ^1H

m Multiplete

MeCN Acetonitrila

MeOD₄ Metanol deuterado

MeOH Metanol

MHz MegaHertz

PEG Polietilenoglicol

q.s.p quantidade suficiente para

RMN de ^{13}C Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN de ^1H Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s simpleto

SNC Sistema Nervoso Central

SUS Sistema Único de Saúde

t Tripleto

TMS Tetrametilsilano

δ Deslocamento químico

λ Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 BIOMA CERRADO	20
1.2 ERYTHROXYLACEAE E O GÊNERO <i>Erythroxylum</i>	22
1.3 ÁCIDO HIALURÔNICO (HA)	27
1.4 HIALURONIDASES	29
1.5 INIBIDORES DE HIALURONIDASE	31
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 MÉTODOS GERAIS	36
3.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	36
3.1.1.1 Fase Estacionária (FE)	36
3.1.1.2 Eluentes (FM)	36
3.1.1.3 Reveladores	36
3.1.2 Cromatografia em Coluna	38
3.1.2.1 Sílica gel 60 A (70-230 mesh) Merck®	38
3.1.2.2 Exclusão em gel Sephadex®	38
3.1.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	39
3.1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	40
3.1.4 Determinação de Fenólicos Totais	40
3.1.5 Determinação de Flavonoides Totais	41
3.1.6 Avaliação da Atividade Antioxidante	42
3.1.7 Toxicidade a Larvas de <i>Artemia salina</i>	43
3.1.8 Ensaio de Inibição Enzimática	43
3.1.8.1 Condições do Ensaio	45
3.1.8.2 Determinação da Porcentagem de Inibição Enzimática e do IC ₅₀ .	46
3.2 PARTE EXPERIMENTAL	47
3.2.1 Material Vegetal: Coleta e Identificação	47
3.2.2 Obtenção dos Extratos Brutos	47
3.2.3 Caracterização Farmacognóstica por CCD	49

3.2.4 Estudo Químico do Extrato Etanólico de <i>Erythroxylum suberosum</i> (EEESflh)	49
3.2.4.1 Cromatografia em Coluna (CC) – Sílica gel 60	50
3.2.4.2 Partição Líquido-Líquido	51
3.2.4.3 Cromatografia em Coluna (CC) - Sephadex (Fração FHM)	52
3.2.4.4 Monitoramento por CLAE - DAD	54
3.2.5 Estudo Químico do Extrato Aquoso de <i>Erythroxylum suberosum</i> (EAESflh)	54
3.2.5.1 Cromatografia em Coluna (CC) – Sephadex®	54
3.2.5.2 Monitoramento por CLAE-DAD e CLAE-IR	54
3.2.6 Estudo Químico do Extrato Hexânico de <i>Erythroxylum suberosum</i> (EHESflh)	55
3.2.6.1 Cromatografia em Coluna (CC) – Sílica gel 60	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 INIBIÇÃO DA HIALURONIDASE	58
4.1.1 Cromoglicato Dissódico (DSCG) e Compostos Fenólicos	58
4.1.2 Extratos Brutos de Espécies de <i>Erythroxylum</i> (screening)	64
4.1.3 Frações do Ext. Etanólico de <i>Erythroxylum suberosum</i> (EEESflh)	68
4.3 ESTUDO QUÍMICO DOS EXT. BRUTOS DE <i>Erythroxylum suberosum</i>	71
4.3.1 Caracterização Farmacognóstica por CCD	71
4.3.2 Constituintes Químicos no Ext. Etanólico e Frações (FHM e FDCM)	74
4.3.2.1 Rutina	74
4.3.2.2 Catequina, Epicatequina e Derivados	76
4.3.2.3 Ácidos Clorogênicos (ACGs)	77
4.3.2.4 Mistura de Hiperosídeo e Isoquercitrina	77
4.3.2.5 Quercetina e Derivados	78
4.3.2.6 ESE02	81
4.3.2.7 Constituintes Químicos nas Subfrações de FHM	87
4.3.2.7.1 Ácidos Clorogênicos (ACGs)	87
4.3.2.7.2 Mistura de Hiperosídeo, Isoquercitrina e Derivados	90
4.3.2.7.3 Quercetina	95
4.3.3 Constituintes Químicos no Extrato Aquoso (EAESflh)	98
4.3.3.1 Mistura de Açúcares: Frutose e Trealose	98
4.3.3.2 Rutina	99

4.3.3.3 Catequina e Epicatequina	100
4.3.3.4 ESA04	101
4.3.4 Constituintes Químicos no Extrato Hexânico (EHESflh)	107
4.3.4.1 Ester Alifático de Cadeia Longa (ESH05, 06, 08, 09 e 13)	107
4.4 ENSAIOS COMPLEMENTARES DE ATIVIDADE FUNCIONAL E TOXICIDADE DOS EXTRATOS DE <i>Erythroxylum suberosum</i>	109
4.4.1 Teor de Fenólicos e Flavonoides Totais	109
4.4.2 Atividade Antioxidante	110
4.4.3 Toxicidade a Larvas de <i>Artemia salina</i>	113
5 CONCLUSÃO	114
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

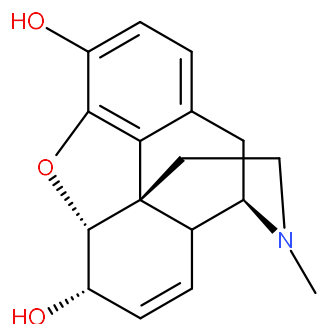
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

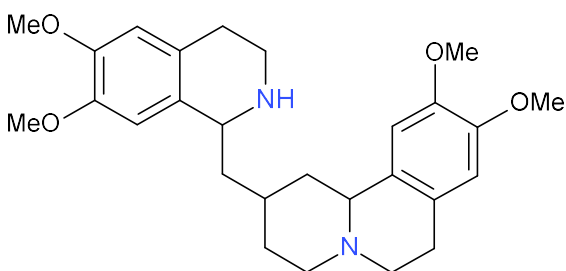
O uso de vegetais com fins terapêuticos acompanha a própria existência humana. O homem primitivo buscou na natureza soluções para satisfazer suas necessidades e dessa relação nasceu um conhecimento que evoluiu através dos tempos, passando pelas gerações, e sendo utilizado, atualmente, como base referencial primária para pesquisas de novos fármacos a partir de plantas (1, 2).

As bases da Fitoterapia encontram-se na Medicina Chinesa e Ayurvédica com relatos do uso de plantas como remédios que remontam a 2500 anos a.C. A antiga civilização egípcia já possuía informações sobre plantas medicinais, preservadas no papiro de Ebers (3), que descreveu um número significativo de doenças e os medicamentos, de origem vegetal ou animal, que poderiam ser empregados para tratá-las. Embora a medicina egípcia se apoiasse em elementos mágicos e religiosos, é sabido que já eram utilizados vegetais como o sene, o zimbros, as sementes do linho, o funcho e o rícino, além de outras plantas (4, 5).

O isolamento da morfina **(1)** de *Papaver somniferum* pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner, marcou o início do processo de extração de princípios ativos em plantas (6). Alguns fármacos potentes foram então descobertos e muitos deles têm usos consagrados na terapêutica atual. Joseph Pelletier, farmacêutico francês, descreveu em 1817, o isolamento da emetina **(2)**, a partir da *Cephaelis ipecacuanha*, considerada um poderoso emético e expectorante em doses menores (7, 8).



(1)



(2)

No cenário atual, o uso de plantas medicinais tem se tornado um hábito por parte da população mundial, que busca nas preparações fitoterápicas ou nas plantas *in natura* uma alternativa mais segura e econômica para tratar suas enfermidades. A medicina tradicional baseada em plantas representa a principal, e talvez a única forma de acesso aos cuidados primários de atenção à saúde para 4,5 bilhões de pessoas em todo o mundo (9).

O Brasil segue essa tendência mundial, incentivando o emprego de práticas complementares nos programas de atenção à saúde. Para isso implantou em 2006 a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, importantes diretrizes à pesquisa e ao desenvolvimento do uso de plantas medicinais e seus derivados (10). Além disso, foi lançada em 2009 a Relação Nacional de Plantas Medicinais, com 71 plantas já utilizadas para fins terapêuticos, para orientar estudos e pesquisas que subsidiassem a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso seguro e eficaz por parte da população (11).

Estima-se que existam mais de 250 mil espécies de plantas superiores em todo o mundo, das quais, apenas uma pequena porcentagem tem sido exaustivamente estudada pelo seu potencial como fonte de novas moléculas (12). Entretanto, grande parte das plantas medicinais comercializadas no mundo são colhidas de forma indiscriminada e correm o risco de serem extintas (9). O Brasil com, aproximadamente, 50 mil espécies de plantas das quais 43% são endêmicas do território nacional, é o maior centro de biodiversidade vegetal no mundo, seguido por China, Indonésia, México e África do Sul (13), e celeiro para pesquisa e desenvolvimento nas áreas de Botânica, Química, Biologia, Farmacologia, Toxicologia e muitas outras.

1.1 BIOMA CERRADO

O Cerrado é considerado o segundo maior bioma da América do Sul, com uma grande diversidade de espécies medicinais. Ocupa cerca de 22% território nacional com abrangência desde o Amapá e Roraima até o Paraná. Está localizado em sua maior extensão no Planalto Central principalmente no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Nessa região encontram-se nascentes das maiores bacias hidrográficas da América do Sul, resultando em um elevado potencial aquífero que favorece sua biodiversidade (14-16).

É reconhecido como a savana mais rica do mundo, responsável por grande parte da biodiversidade mundial, abrigando mais de 11 mil espécies de plantas catalogadas. Destas, 220 encontram uso medicinal pelas populações nativas e 416 espécies podem ser usadas na recuperação de solos degradados, como barreiras contra o vento e proteção contra a erosão (15).

Sua vegetação está sob forte influência da sazonalidade, ocasionada em parte pela grande extensão territorial desse bioma, bem como pela ação de queimadas nas estações mais secas do ano. Grandes áreas do Cerrado têm sido destruídas dando lugar a pastagens e plantações de soja, milho e cana-de-açúcar (17), para produção de etanol ou outro biodiesel. Tal cenário tem contribuído para a destruição acelerada da vegetação natural e conversão de cerca de 80% do bioma Cerrado em áreas atóricas (18-20).

Apesar de possuir tanta riqueza, esse bioma está seriamente comprometido, constituindo uma das regiões com maiores riscos de extinção de espécies do planeta, e é considerado um *hotspot* mundial, ou seja, área de conservação prioritária, devido à ameaça de extinção no mais alto grau, em que se tenha perdido mais de três quartos de sua vegetação original (21, 22).

Além de servirem de alimento, as plantas do Cerrado são dotadas de propriedades medicinais e sua utilização faz parte da tradição e costumes locais. Contudo, o interesse da comunidade científica em estudar estes vegetais ocorre de forma tímida, se comparada com as das demais regiões, resultando na carência de dados que deem embasamento científico às práticas populares. Das espécies existentes, muitas são conhecidas e utilizadas como remédios supostamente eficazes para um grande número de moléstias (23). Outras não são utilizadas na etnomedicina e não se conhece ainda seu potencial terapêutico ou tóxico expondo a necessidade de estudos que mostrem a utilidade, uso e manejo adequados desses vegetais (24).

O Distrito Federal situa-se na porção central do Cerrado, onde é intenso o conflito entre medidas conservacionistas e atividades econômicas (25). Mais da metade da vegetação nativa foi destruída, devido ao crescimento desordenado das cidades, aparecimento de condomínios irregulares, assentamentos e invasões, que aniquilaram veredas, campos limpos e matas de galeria causando o desaparecimento de espécies (26).

Muitas espécies foram extintas sem que fossem estudadas, ou sequer conhecidas, eliminando a oportunidade de novas descobertas sobre a biodiversidade

desse importante bioma. Assim, além de incentivar a regeneração da cobertura vegetal para a recuperação ao menos em parte, da biodiversidade perdida, é importante o desenvolvimento de estudos que visem o conhecimento do potencial de espécies ainda não estudadas.

1.2 ERYTHROXYLACEAE E O GÊNERO *Erythroxylum*

A família Erythroxylaceae possui cerca de 240 espécies de distribuição tipicamente tropical. É composta por 4 gêneros, dos quais, *Erythroxylum* P. Browne é o mais importante, contendo maior número de espécies e ampla distribuição pelos continentes, com centro de diversidade e endemismo na América do Sul, principalmente no Brasil e na Venezuela. Os gêneros *Aneulophus* Benth., *Nectaropetalum* Engl. e *Pinacopodium* ocorrem exclusivamente na África (27-29).

No Brasil foram registradas, até o momento, 127 espécies de *Erythroxylum*, grande parte em ambientes florestais da Mata Atlântica e Amazônia. O Cerrado, que ocupa a região central do Território Nacional, abriga, aproximadamente 36 espécies de *Erythroxylum* (30).

Quimicamente, o gênero se caracteriza pela presença de alcaloides do grupo tropano, dentre os quais se destaca a cocaína **(3)**, um alcaloide natural que é produzido, principalmente por *Erythroxylum coca* e *Erythroxylum novogranatense*. Estima-se que *E. coca* seja cultivada na América do Sul por cerca de 5.000 anos com registros arqueológicos da utilização de suas folhas que datam de 3000 a.C. Suas folhas eram mascadas para redução da fome e cansaço e sua utilização como anestésico local data de 1879 (29).

Erythroxylum coca e *E. novogranatense* são as espécies mais importantes, do ponto de vista socioeconômico, por produzirem cocaína de forma significativa em relação a outras que apresentam apenas traços desse alcaloide em sua composição micromolecular (31, 32)

Alcaloides tropânicos constituem principal grupo de constituintes do gênero *Erythroxylum*. Um levantamento bibliográfico realizado por Oliveira *et al* (2010) apresentou 186 alcaloides tropânicos em 35 espécies de *Erythroxylum* distribuídas em todo o mundo. Essa classe de compostos contribui para caracterização quimiotaxonômica de plantas desse gênero, apresentando importantes ações farmacológicas e toxicológicas (33, 34).

Apesar da ampla distribuição geográfica, poucas espécies de *Erythroxylum* utilizadas na medicina popular foram investigadas. Os estudos realizados no gênero concentraram-se nas espécies produtoras de cocaína, sobretudo *E. coca* e *E. novogratense* (35).

Segundo Oliveira (2012) (36), em levantamento bibliográfico utilizando dados do NAPRALERT (*Natural Products ALERT*, banco de dados da Universidade de Illinois), das 230 espécies de *Erythroxylum*, apenas 61 foram avaliadas quimicamente resultando no isolamento e caracterização de 449 compostos, dos quais a maior prevalência foi para alcaloides de núcleo tropânico (32, 34, 37-39), terpenoides (40-43) e flavonoides (42), com presença em menores quantidades de outras classes como alcaloides, benzenoides, cumarinas, quinonas, alquinos, esteroides, proteínas e lipídios (36).

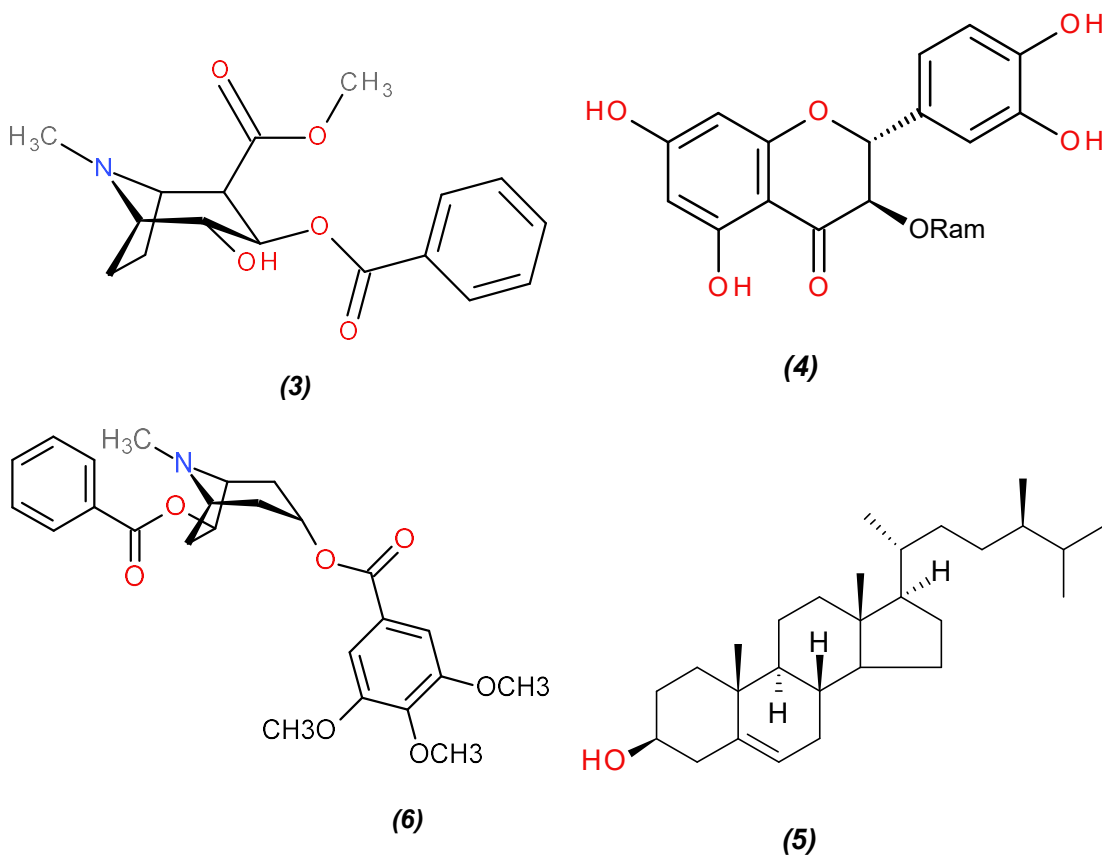
Espécies de *Erythroxylum* são utilizadas na medicina popular como anti-inflamatório, antibacteriano, laxante, diurético, tônico estimulante, contra hemorragias, disfunções hepáticas, renais, vesiculares e respiratórias como pneumonia, tuberculose e bronquite asmática (44, 45).

Com ampla distribuição geográfica, algumas plantas desse gênero utilizadas na medicina tradicional, são alvo de estudos que tentam relacionar a atividade biológica com a composição micromolecular de seus extratos. Das partes aéreas de *Erythroxylum gonocladum* foram isolados os compostos astilbina, β -sitosterol e uma mistura dos ácidos graxos palmítico, esteárico e linoleico. O extrato etanólico das partes aéreas de *E. gonocladum* exibiu atividade antihipertensiva por meio da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), ação atribuída à presença do composto astilbina (4) na composição dos extratos dessa espécie (46).

Um estudo feito para validar a utilização de espécies de Erythroxylaceae, predominantes na África do Sul, no tratamento doenças infecciosas, como disenteria e diarreia, comprovou a atividade antibacteriana dos extratos das folhas e cascas de: *Erythroxylum delagoense* contra *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*; *Erythroxylum emarginatum* contra *Klebsiella pneumoniae*; e *Erythroxylum pictum* contra *Bacillus subtilis* e *Klebsiella pneumoniae* (47).

Erythroxylum caatingae exibiu atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e contra fungos, principalmente *Candida albicans*. Além disso, frações acetato de etila:metanol (95:5), acetato de etila, e clorofórmio, obtidas do caule dessa

espécie, como também o composto isolado catuabina B (**6**) induziram apoptose em células tumorais da linhagem K562, caracterizando uma ação citotóxica (48).



No Distrito Federal, 12 espécies de *Erythroxylum* podem ser encontradas nos diferentes gradientes de Cerrado (49), dentre elas *E. suberosum* A St.-Hil., *E. daphnites* Mart., *E. subrotundum* A.St.-Hil (30).

Erythroxylum daphnites é conhecida como “muxiba”, “fruta-de-pombo”, “chapadinho”, “mercúrio” e “pimenta”. Pode ser encontrada em áreas abertas do Cerrado, campo rupestre e áreas de mata ciliar (50). Das partes aéreas desta espécie foram identificados esteroides, tri e diterpenoides, flavonoides, glicerídeos e lignana (50, 51). Quanto à atividade biológica, existem relatos de ação antioxidante e ação antifúngica, com potencial inibitório sobre isolados clínicos de *Candida glabrata* (50, 52, 53). O extrato hexânico dessa espécie mostrou potencial citotóxico em estudo com câncer de boca, induzindo morte celular por apoptose (54).

Erythroxylum subrotundum é uma espécie endêmica no Brasil, ocorrendo em Estados do Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Tem como domínios fitogeográficos a Caatinga, o Cerrado (latu senso) e Mata Atlântica (30). Desta espécie foram isolados dois flavonoides 3-O-glicosilados (36). Em estudo de citotoxicidade, inibiu proliferação celular de linhagens cancerígenas (NCI-H292 e K562) e carcinoma de Ehrlich havendo relatos na literatura para atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e fungos (53, 55)

Erythroxylum suberosum é um subarbusto de ocorrência comum em áreas abertas de Cerrado com ampla distribuição no território nacional. É conhecido como “fruta-de-pomba-do-campo”, “mercúrio-do-campo”, “mercureiro”, “sombra-de-touro” e “cabelo-de-nego”. Seus frutos ocorrem no período chuvoso e servem de alimentação para algumas espécies de aves; sua madeira é utilizada na carpintaria e marcenaria; e suas cascas no processo de curtimento do couro (24, 56). Na medicina popular é utilizado como remédio contra má digestão, como antireumático e como anestésico (57). Em uma análise preliminar não foi detectada cocaína nesta espécie (35).

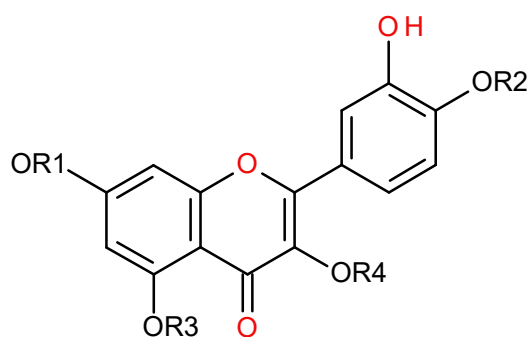
Do ponto de vista químico, *E. suberosum* foi pouco estudado, sendo relatados para a espécie até o momento, metabólitos secundários identificados nas folhas como os flavonoides quercetina (7) e seus derivados glicosilados hiperosídeo (8), isoquercitrina (9), ombuina-3- rutinosídeo (10), rutina (11) e o alcaloide calistegina A₃ (12). Da raiz foi isolada a mistura de catequina (13) e epicatequina (14). No caule foram identificados, em mistura, os esteroides campesterol (15), estigmasterol (16) e β -sitosterol (5) (31, 58-60).

Em estudo químico do extrato etanólico dos galhos de *E. suberosum*, guiado pelo ensaio de letalidade para *A. salina*, foram isolados 3 diterpenos abietânicos e 2 de esqueleto tipo *ent*-kaurano, presentes na fração ativa. Quatro dos cinco diterpenos, 7- oxo-16-hidróxi-abiet-15(17)-en-19-al (17), 7- oxo-abiet-15(17)-en-16-ol (18), 7 α ,16-dihidróxi-abiet-15(17)-en-19-al (19) e *ent*-7 α ,15 β -di-hidróxi-caur-16-en-19-oato de metila (20), apresentaram potencial efeito citotóxico frente às larvas de *Artemia salina* (60).

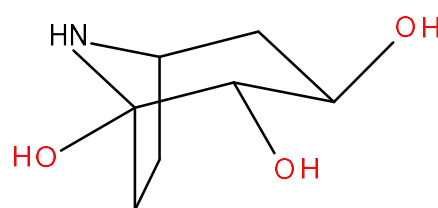
Extratos de *E. suberosum* inibiram as enzimas catepsinas K, L e V em concentrações de 5 e 50 μ g/mL (58). Em estudo realizado por Violante *et al* (2012), que avaliou a ação antimicrobiana de algumas plantas medicinais do Cerrado sobre bactérias gram-negativas, gram-positivas e fungos, *E. suberosum* apresentou

atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* (61)

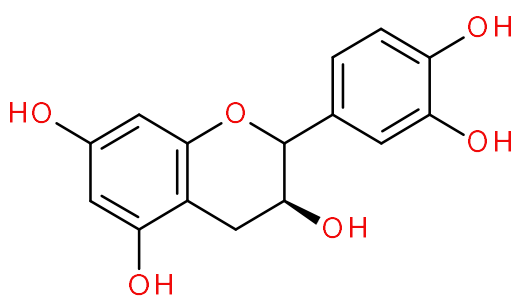
Quanto à citotoxicidade, um estudo realizado por Macedo *et al* (2016) mostrou que os extratos de *E. suberosum* apresentaram potencial atividade radiosensibilizante *in vitro* no câncer de cabeça e pescoço sendo o extrato aquoso mais ativo contra os carcinomas de língua e hipofaringe em associação à radioterapia (62).



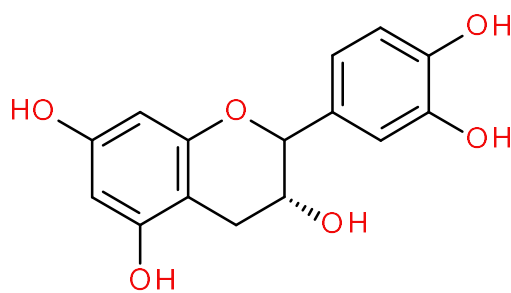
	R1	R2	R3	R4
(7)	H	H	H	H
(8)	H	H	H	gal
(9)	H	H	H	gli
(10)	Me	Me	H	ram-gli
(11)	H	H	H	ram-gli



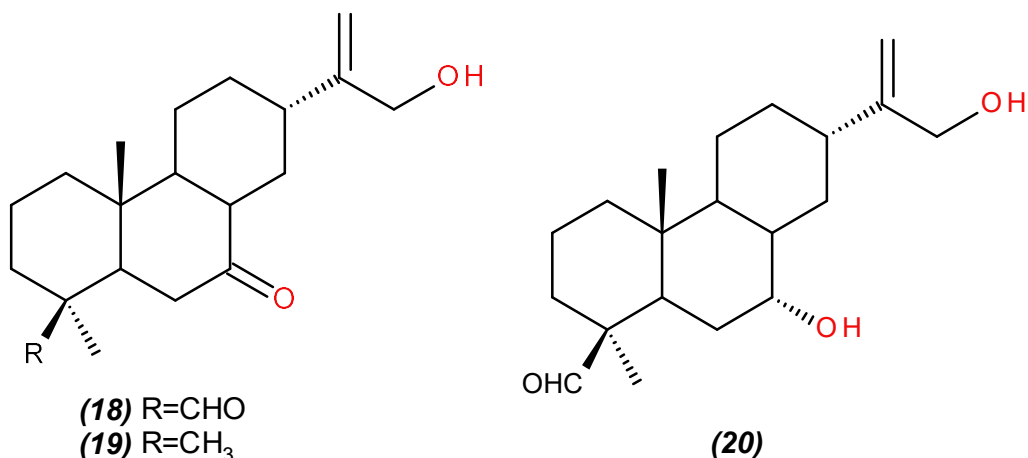
(12)



(13)



(14)



1.3 ÁCIDO HIALURÔNICO (HA)

O ácido hialurônico (hialuronano) é membro da família dos glicosaminoglicanos, juntamente com a condroitina e heparina, polímeros de alto peso molecular compostos por unidades dissacarídicas de aminoaçúcares (N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosaminas) e ácidos urônicos (glicurônico, idurônico) interligados entre si por ligações glicosídicas alternadas do tipo β -1,4 e β -1,3 (63).

Diferente dos outros glicosaminoglicanos, suas cadeias não sofrem sulfatações e estão dispostas em conformação dupla helicoidal devido à ligação de hidrogênios internos e sucessivas torções na molécula. Porém, acredita-se que em meio aquoso possa haver modificação na conformação estrutural desse biopolímero, havendo formação de fragmentos menores de conformação simples. Essas características aliadas à existência de centros hidrofóbicos na molécula, conferem ao ácido hialurônico alta flexibilidade originando soluções muito viscosas de elevado peso molecular, aumentando cerca de 1000 vezes o seu volume em meio aquoso. Nesse estado, a difusão de proteínas e eletrólitos é substancialmente facilitada (64, 65).

Sua síntese é realizada por hialuronano sintase, enzima vinculada à membrana plasmática e secretada diretamente em meio extracelular. É influenciada por vários fatores como hormônios e mediadores inflamatórios. Tem importante papel nos processos de proliferação, crescimento e migração celular bem como em metástases de células tumorais. Sua produção está aumentada em processos inflamatórios e de

cicatrização como também nos processos de morfogênese e desenvolvimento embrionário (66).

Não é de ocorrência exclusiva de vertebrados podendo ser encontrado em bactérias e vírus. É obtido, tradicionalmente, por extração a partir de tecidos animais, como humor vítreo bovino e cordões umbilicais, entretanto, a produção fermentativa por algumas cepas de *Streptococcus* promove rendimentos com maior concentração de ácido hialurônico a custos reduzidos. O processo de purificação na obtenção do ácido hialurônico gera algumas desvantagens como a degradação de suas cadeias com redução do peso molecular e de sua capacidade funcional (67).

É um dos principais constituintes da matriz extracelular, encontrado nos fluidos corporais em concentrações variadas. Na pele, que funciona como reservatório primário, concentra-se aproximadamente 50% de hialuronano do corpo. Também é encontrado no humor vítreo (0,1 a 0,4 mg/g), no fluido sinovial (3 a 4 mg/mL), na matriz produzida pelas células que circundam o oócito (0,5 mg/mL) e na matriz patológica que promove oclusão arterial (68).

Suas ações estão relacionadas à interação com uma variedade de receptores e proteínas de ligação em membranas celulares. O receptor mais estudado é o CD44 (receptor de linfócitos) expresso em diversos tipos de células com função de adesão celular, incluindo linfócitos, células mieloides, fibroblastos, retina e células gliais do Sistema Nervoso Central (SNC). Outros receptores e proteínas de ligação com o hialuronano foram identificados, dentre elas o RHAMM (receptor de motilidade AH - mediada), ICAM-1 (molécula de adesão intercelular – 1) e receptor LEC (receptor de células endotéliais do fígado) (63).

Para alguns autores, os benefícios do ácido hialurônico são promovidos pelo comprimento da sua cadeia e capacidade de interagir com a água (69, 70). Suas aplicações e usos relacionam-se diretamente à sua presença em vários tecidos conectivos de animais, tais como pele e cartilagem e a importantes funções relacionadas à flexibilidade e manutenção da estrutura dos tecidos (67). Além disto, encontra inúmeras aplicações clínicas tais como: procedimentos cirúrgicos para auxiliar os processos regenerativos; suplementação ou substituição do humor vítreo em cirurgias oftálmicas; na cicatrização de córnea, pé diabético, tendões, mucosa nasal, e no tratamento de osteoartrites (65, 71-73). Ainda, pode ser usado na tecnologia farmacêutica, melhorando a partição de fármacos, ajudando em sua

absorção pela pele humana. Conjugado com polímeros sintéticos, é utilizado em fármacos anti-inflamatórios de liberação prolongada (74).

Atualmente, uma de suas principais aplicações está na dermatologia em preenchimentos subcutâneos para corrigir depressões, rugas e sulcos. Devido às suas excepcionais propriedades físicas, o ácido hialurônico desempenha um papel predominante na estrutura e organização da derme e ajuda a garantir a flexibilidade e a firmeza da pele. É sabido que o teor de ácido hialurônico diminui com a idade, e que alterações na sua disponibilidade e síntese contribuem para o envelhecimento evidenciado pela formação de rugas e diminuição da elasticidade da pele (75, 76).

O HA de ocorrência natural é rapidamente quebrado pela enzima hialuronidase e eliminado por meio dos vasos linfáticos e pelo metabolismo hepático. Após aplicação subcutânea é absorvido gradativamente ao longo dos meses (77).

A fragmentação do hialuronano gera polímeros entre 4 a 20 mil Da, *in vivo*, e apresenta efeito paradoxal; moléculas com alto peso molecular têm propriedades anti-inflamatórias, antiangiogênicas e imunossupressoras, enquanto que fragmentos de baixo peso molecular podem se relacionar à angiogênese e estabelecimento de processos inflamatórios com liberação de citocinas que induzem respostas inflamatórias em macrófagos e células dendríticas secundárias à infecção e lesão tecidual (78).

1.4 HIALURONIDASES

As hialuronidases são classes de enzimas que degradam glicosaminoglicanos, predominantemente o ácido hialurônico; porém podem degradar condroitina e sulfato de condroitina, embora em proporções menores (63).

As hialuronidases foram denominadas inicialmente como fator de difusão (*spread factor*) e estão presentes nas cepas β -hemolíticas de *Streptococcus*, venenos de cobras, abelhas, vespas, escorpiões, nematoides e sanguessugas; têm como função auxiliar a difusão dessas toxinas no organismo das suas vítimas (79).

São encontradas em vários tecidos como testículos, olho, pele, baço, fígado, rins e útero, além de fluidos corporais como a lágrima, sangue e espermatozoides. Em mamíferos, a hialuronidase testicular é necessária para a fertilização do óvulo (80).

Foram classificadas por Meyer, em 1971, dentro de três famílias distintas, de acordo com o mecanismo catalítico de cada uma (63) (Figura 1):

Hialuronidases (EC 3.2.1.35): são 4-glicanohidrolases que degradam o hialuronano por clivagem na ligação glicosídica β -1,4 com o tetrassacarídeo como principal produto de degradação. Essas enzimas também degradam condroitina, condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato como também o sulfato de dermatana em menor proporção. São encontradas em espermatozoides de mamíferos, lisossomas, venenos de himenópteros e peçonhas de serpentes.

Hialuronidases (EC3.2.1.36): são 3-glicanohidrolases que degradam o HA por clivagem nas ligações glicosídicas β -1,3 e têm como produto de degradação o tetrassacarídeo ou o hexassacarídeo. Estão presentes em sanguessugas, parasitos e crustáceos.

Hialuronidases (EC 4.2.2.1): são conhecidas como hialuronato liases que degradam o HA por uma reação de β -eliminação produzindo dissacarídeos que contêm resíduos de glicuronosil apresentando uma ligação dupla entre os carbonos 4 e 5.

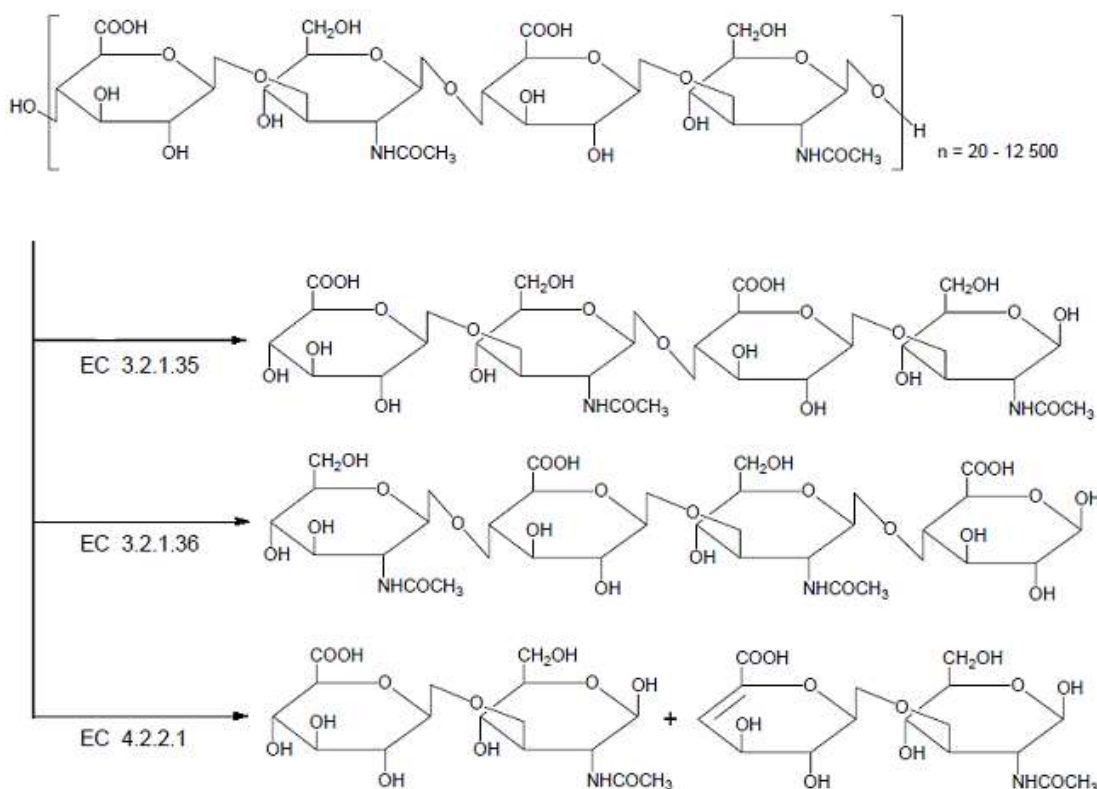


Figura 1 - Classificação das hialuronidases segundo Meyer (1971) (63)

Existe outra classificação, alternativa a de Meyer (1971), que divide as hialuronidases em: procarióticas e eucarióticas, onde se encontram as hialuronidases decodificadas pelo genôma humano em 3p31.3 (Hyal-1, Hyal-2 e Hyal-3), em 7q31.3 (Hyal-4, PH-20 e Hyalp-1) (63).

Assim como o ácido hialurônico, as hialuronidases têm sido utilizadas na terapêutica. A hialuronidase por sua vez, é utilizada em medicamentos injetáveis como adjuvante de difusão local que facilita a absorção por meio da redução da viscosidade do cimento intercelular. Em vacinas e em anestésicos subcutâneos, a enzima acelera a ação do fármaco e aumenta a área anestesiada (79). Além dos exemplos citados, o hialuronano e as hialuronidases também são utilizados para vários outros fins, desde diagnóstico, na cosmetologia, em cirurgias plásticas, e outros. Dessa forma, o sistema hialuronano-hialuronidase é de extrema importância.

1.5 INIBIDORES DE HIALURONIDASE

Os inibidores de hialuronidases são agentes reguladores, naturais ou sintéticos, envolvidos na manutenção do equilíbrio entre o anabolismo e o catabolismo do ácido hialurônico. Em geral apresentam grande diversidade estrutural, podendo ser proteínas, glicosaminoglicanos, polissacarídeos e metabólitos secundários de origem vegetal (78).

Sais de ferro, cobre e de zinco e heparina foram reportados como os primeiros inibidores de hialuronidase por Meyer, em 1951. Os glicosaminoglicanos exercem seu efeito inibidor sobre a hialuronidase devido a semelhanças na estrutura química com o hialuronano, substrato dessa enzima (63).

Fármacos anti-inflamatórios e antialérgicos, incluindo salicilatos, indometacina, fenilbutasona e dexametasona, inibiram a atividade da hialuronidase isolada de testículos e de peçonha de serpentes. Entre os fármacos antialérgicos encontra-se o cromoglicato dissódico (DSCG), inibidor conhecido da hialuronidase, que teve sua eficácia avaliada em estudos anteriores (63, 81). É utilizado no tratamento de doenças alérgicas, pois inibe a liberação de mediadores químicos e promove a estabilização da membrana celular, reduzindo a resposta alérgica e a reação inflamatória no organismo (82).

Muitos fármacos utilizados no arsenal terapêutico apresentam, em menor ou maior grau, a capacidade de inibir a hialuronidase: ácido ascórbico e seus análogos;

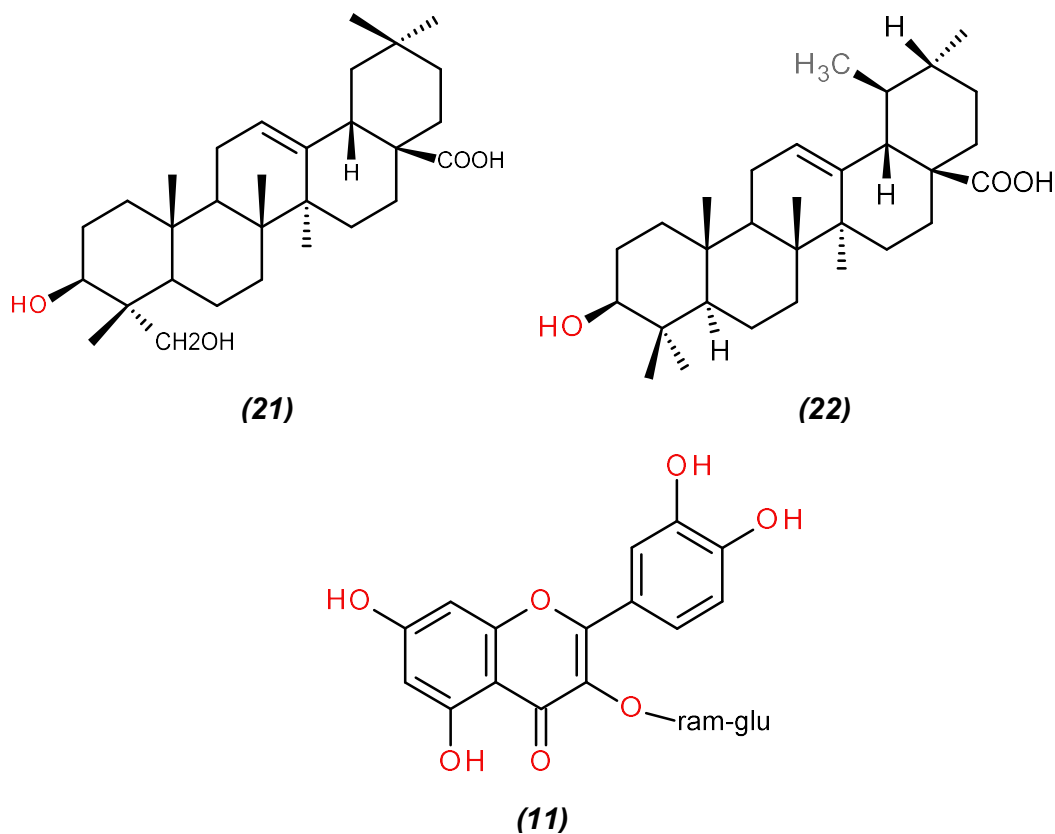
flavonoides tais como quercetina, apigenina, kaempferol, rutina, miricitrina e outros (68, 83); alcaloides como reserpina, ácido aristolóquico, ajmalicina; triterpenos e derivados do ácido cafeico (78, 84, 85).

Um grupo de 31 flavonoides foram testados, inicialmente, frente à enzima hialuronidase testicular bovina, por Kuppusamy, em 1990. Dentre os flavonoides investigados, os taninos condensados apresentaram inibição máxima da enzima em 50 μ M. Outros compostos como silibina, apigenina, luteolina, morina, miricetina e quercetina, inibiram a enzima entre 29% e 76%, na concentração de 250 μ M. O estudo cinético mostrou que essa inibição era competitiva e que algumas características da molécula favoreciam o efeito exercido pelo composto sobre a enzima. A presença de dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do núcleo fundamental dos flavonoides era condição necessária para haver atividade por parte do composto; um grupo ceto na posição 4 e a introdução de hidroxilas em 5, 7 e 4' pareciam aumentar o efeito dos flavonoides; porém a presença de substituintes glicosídicos diminuía o efeito inibitório sobre a enzima testicular bovina. Dessa forma, o autor concluiu que as agliconas são melhores inibidores de hialuronidase que seus derivados glicosilados (86)

A quercetina isolada a partir de plantas mostrou-se ativa em estudos anteriores em níveis diferentes de inibição. Isoquercitrina, hiperosideo e rutina também foram ativos frente a enzima hialuronidase (87-90). Além de compostos isolados de fontes naturais, extratos vegetais têm apresentado forte potencial inibitório sobre a hialuronidase caracterizando-os como fonte promissora de novas moléculas farmacologicamente ativas (89, 91-94)

Espécies vegetais presentes em regiões de cerrado do Distrito Federal e seu entorno, estudadas por este grupo, têm revelado ser fonte de compostos com atividade antimicrobiana (23, 95), citotóxica (96, 97), anti-inflamatória e antinociceptiva, dentre outras (98-100).

Para muitos desses compostos isolados há registro de atividade de inibição da hialuronidase. Como exemplo pode ser citado derivados de hederagenina (**21**) (101), também isolados de *Sapindus saponária* (102); rutina (**11**) (103), também isolada de *Hancornia speciosa* (23) e ácido ursólico (**22**) (104), também isolado de espécies de *Pouteria* (96).



Esses achados revelam o grande potencial das espécies ocorrentes no Cerrado brasileiro, com destaque para a família Erythroxylaceae, caracterizada pela presença de metabólitos farmacologicamente ativos, como alcaloides tropânicos e flavonoides. Contudo, é necessário que haja mais estudos para conhecimento e caracterização de princípios ativos e ações farmacológicas de espécies da flora brasileira especialmente as que se encontram sob risco de extinção.

Considerando também a grande importância da hialuronidase, a identificação e caracterização de inibidores dessa enzima, potentes reguladores que mantêm a homeostase do ácido hialurônico, pode ser útil no desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios, rejuvenescedores, antimicrobianos, antitumorais, contraceptivos, dentre outros.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de espécies do gênero *Erythroxylum* em inibir a atividade da enzima hialuronidase.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar estudo químico, biomonitorado por hialuronidase, do extrato da espécie que apresentar maior atividade frente à enzima hialuronidase.

Caracterizar a atividade funcional e a toxicidade da espécie mais ativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Devienne K, Raddi G, Pozetti G. Das plantas medicinais aos fitofármacos. Rev Bras Plant Medicin. 2004;11-4.
2. Ribeiro EMO, Lima LS, David JM, Vale AE, Lopes LMX, David JP. A new tropane alkaloid and other constituents of *Erythroxylum rimosum* (Erythroxylaceae). Phytochemistry Letters. 2013;6(2):232-5.
3. Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VS, Lopes NP, Epifanio RA. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Quím Nova. 2002;25(1):45-61.
4. Duarte MCT. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Rev MultiCiência. 2006;7:17.
5. Cunha AP. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia. 2005 25/08/2016. Available from: http://www.ppmac.org/sites/default/files/aspectos_historicos.pdf.
6. Schulz V. Medicinal plants, phytomedicines, and phytotherapy. In: Rational phytotherapy: Springer; 2001. p. 1-39.
7. Miguel MD, Miguel OG. Desenvolvimento de fitoterápicos. . Ribeirão Preto: Tecmed; 2004. 115 p.
8. Simoes CMO. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed: UFRGS; Florianópolis: UFSC; 2001.
9. Cordell GA. Phytochemistry and traditional medicine: a revolution in process. Phytochemistry Letters. 2011;4(4):391-8.
10. Carvalho ACB, Nunes DSG, Baratelli TG, Shuqair NSMSAQ, Netto EM. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. T&C Amazônia. 2007;5(11):26-32.
11. BRASIL. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Espécies vegetais. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.
12. Panda LPSK. Medicinal plants: potencial to fight superiority diseases. Ann Pharma Res. 2013;1(1):8-17.
13. Fioravanti C. A maior diversidade de plantas do mundo. 2016 25/07/2016. Available from: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2016/03/21/a-maior-diversidade-de-plantas-do-mundo/?cat=ciencia>.

14. Silva JMC, Bates JM. Biogeographic patterns and conservation in the South American Cerrado: A tropical savanna *hotspot* The Cerrado, which includes both forest and savanna habitats, is the second largest South American biome, and among the most threatened on the continent. *BioScience*. 2002;52(3):225-34.
15. MMA. O Bioma Cerrado Brasil: Ministério do Meio Ambiente; 2016 [25/07/2016]. Available from: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>.
16. Rigonato VD, Almeida MG. A singularidade do Cerrado: a interrelação das populações tradicionais com as fitofisionomias. VIII Encontro Regional de Geografia: a geografia no mundo da diversidade; Cidade de Goiás: Anais, UFG; 2003.
17. Klink CA, Machado RB. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conserv Biol*. 2005;19(3):707-13.
18. Pin Koh L. Potential habitat and biodiversity losses from intensified biodiesel feedstock production. *Conserv Biol*. 2007;21(5):1373-5.
19. Ramos LP, Wilhelm HM, editors. Current status of biodiesel development in Brazil. Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals; 2005: Springer.
20. Leite RCC, Leal MRLV, Cortez LAB, Griffin WM, Scandiffio MIG. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? *Energy*. 2009;34(5):655-61.
21. Foglio MA, Queiroga CL, SOUSA IMO, Rodrigues RAF. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. *Rev Multiciência UNICAMP*. 2006;7:1-8.
22. Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GA, Kent J. Biodiversity *hotspots* for conservation priorities. *Nature*. 2000;403(6772):853-8.
23. Barros IMC. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2008.
24. Aquino FG, Walter BMT, Ribeiro JF. Espécies vegetais de uso múltiplo em reservas legais de cerrado-Balsas, MA. *Rev Bras de Biociências*. 2007;5(S1):pg. 147-9.
25. Corrêa RS, Silva LL, Baptista GMM. Efeito de uma cobertura morta sobre o intervalo hídrico ótimo e o desenvolvimento de ipê-roxo em área minerada no Cerrado. *Rev Pesq Aplic Eng*. 2008;1(1).
26. Romero MB. As Características do lugar e a sustentabilidade de Brasília. P@ranoá–Periódico Eletrônico de Arquitetura e Urbanismo [Internet]. 2006 25/08/2016. Available from:

https://www.researchgate.net/publication/255662095_AS_CHARACTERISTICAS_DO_LUGAR_E_A_SUSTENTABILIDADE_DE_BRASILIA.

27. Lima JLC. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco: Erythroxylaceae. Rodriguésia-Inst Pesq Jard Bot Rio de Janeiro. 2015;66(1):285-95.
28. Plowman T, Hensold N. Names, types, and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). Brittonia. 2004;56(1):1-53.
29. Loiola MIB, Agra MF, Baracho GS, Queiroz RT. Flora of Paraíba, Brazil: Erythroxylaceae Kunth. Act Bot Bras. 2007;21(2):473-87.
30. Lima JLC. Erythroxylaceae. In: Flora do Brasil 2020 em construção 2016 20/08/2016. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB111>.
31. Brock A, Bieri S, Christen P, Dräger B. Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species. Phytochemistry. 2005;66(11):1231-40.
32. Zuanazzi JAS, Tremea V, Limberger RP, Sobral M, Henriques AT. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. Biochem Syst Ecol. 2001;29(8):819-25.
33. Oliveira SL, Silva MS, Tavares JF, Sena-Filho JG, Lucena HF, Romero MA, et al. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum* Genus: Distribution and Compilation of ¹³C NMR Spectral Data. Chem Biodivers. 2010;7(2):302-26.
34. Oliveira SL, Tavares JF, Branco MV, Lucena HF, Barbosa-Filho JM, Agra MF, et al. Tropane alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. Chem Biodivers. 2011;8(1):155-65.
35. Bieri S, Brachet A, Veuthey JL, Christen P. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. J Ethnopharmacol. 2006;103(3):439-47.
36. Oliveira SL. Fitoquímica de espécies de *Erythroxylum* do semiárido: isolamento e determinação estrutural de alcaloides tropânicos, flavonoides e diterpenos [Tese]. Paraíba: Universidade Federal da Paraíba; 2012.
37. Chin YW, Jones WP, Waybright TJ, McCloud TG, Rasoanaivo P, Cragg GM, et al. Tropane aromatic ester alkaloids from a large-scale re-collection of *Erythroxylum pervillei* stem bark obtained in Madagascar. J Nat Prod. 2006;69(3):414-7.
38. Zanolari B, Guilet D, Marston A, Queiroz EF, de Q. Paulo M, Hostettmann K. Tropane Alkaloids from the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. J Nat Prod. 2003;66(4):497-502.

39. Zanolari B, Guilet D, Marston A, Queiroz EF, Paulo Mde Q, Hostettmann K. Methylpyrrole tropane alkaloids from the bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. J Nat Prod. 2005;68(8):1153-8.
40. Ansell SM, Pegel KH, Taylor DAH. Diterpenes from the timber of *Erythroxylum pictum*. Phytochemistry. 1993;32(4):945-52.
41. Barreiros ML, David JM, Pereira PAP, Guedes ML, David JP. Fatty Acid Esters of Triterpenes from *Erythroxylum passerinum*. J Braz Chem Soc. 2002;13.
42. Barreiros ML, David JM, de Queiroz LP, David JP. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. Biochem Syst Ecol. 2005;33(5):537-40.
43. Santos CC, Lima MAS, Braz Filho R, Silveira ER. Diterpenes from *Erythroxylum barbatum*. J Brazil Chem Soc. 2006;17(7):1304-8.
44. González-Guevara JL, Vélez-Castro H, González-García KL, Payo-Hill AL, González-Lavaut JA, Molina-Torres J, et al. Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species. Biochem Syst Ecol. 2006;34(6):539-42.
45. Rodrigues VEG, Carvalho Dd. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais. Ciência e Agrotecnologia. 2001;25(1):102-23.
46. Filho MDL, Silva GC, Côrtes SF, Guia TRM, Ferraz VP, Serra CP, et al. ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) OE Schulz. Phytomedicine. 2010;17(5):383-7.
47. Wet HD. Antibacterial activity of the five South African Erythroxylaceae species. Afr J Biotechnol. 2011;10(55):11511-4.
48. Aguiar JS, Araújo RO, do Desterro Rodrigues M, Sena KX, Batista AM, Guerra MM, et al. Antimicrobial, antiproliferative and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. Int J Mol Sci. 2012;13(4):4124-40.
49. Barros MG. Sistemas reprodutivos e polinização em espécies simpátricas de *Erythroxylum* P. Br.(Erythroxylaceae) do Brasil. Braz J Bot. 1998;21(2):159-66.
50. Martins DHN. Avaliação da sazonalidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante de folhas de *Erythroxylum daphnites* Mart. [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2015.
51. Simas PH, Sarmiento UC, Almeida LHO, Dornelles CF, Garcez WS, Garcez FR. Diterpenoides, derivados de fenilpropanoides e outros constituintes químicos de *Erythroxylum daphnites* Mart. In: Anais 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; Natal - RN: SBC; 2013.

52. Correia AF. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas do Cerrado brasileiro sobre isolados clínicos de *Candida* SPP [Tese]. Brasília: Universidade de Brasília; 2016.
53. Correia AF, Silveira D, Fonseca-Bazzo YM, Magalhães PO, Fagg CW, da Silva EC, et al. Activity of crude extracts from Brazilian Cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. *BMC Comp Altern Med*. 2016;16(1):1.
54. Elias ST, Borges GA, Amorim DA, Rêgo DF, Simeoni LA, Silveira D, et al. Radiation induced a supra-additive cytotoxic effect in head and neck carcinoma cell lines when combined with plant extracts from Brazilian Cerrado biome. *Clin Oral Invest*. 2015;19(3):637-46.
55. Aguiar JS. Estudos das atividades antimicrobiana e anticâncer de *Erythroxylum caatingae* Plowman e *Erythroxylum subrotundum* A. St-Hil [Tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2011.
56. Neto GG, Morais R. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Bot Bras*. 2003;17(4):561-84.
57. Barbosa W, Pinto L. Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu-sudeste do Pará. *Rev Bras de Farmacogn*. 2003;13:47-9.
58. Nascimento MNGd. Estudo químico de *erythroxylum suberosum* (erythroxylaceae) frente às catepsinas K, L e V [Dissertação]: Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão; 2014.
59. Leite CFM, Leite BHM, de Carvalho Barros IM, Gomes SM, Fagg CW, Simeoni LA, et al. Determination of rutin in *Erythroxylum suberosum* extract by liquid chromatography: applicability in standardization of herbs and stability studies. *Bol Lat Caribe Plant Med y Aromáticas*. 2014;13(5).
60. Nascimento CJ, Violante IMP, Garcez WS, Pott A, Garcez FR. Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*. *Phytochemistry Letters*. 2012;5(2):401-6.
61. Violante IMP, Hamerski L, Garcez WS, Batista AL, Chang MR, Pott VJ, et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. *Braz J Microbiol*. 2012;43(4):1302-8.
62. Macedo TB, Elias ST, Torres HM, Silva FPY, Silveira D, Magalhães PO, et al. Cytotoxic Effect of *Erythroxylum suberosum* Combined with Radiotherapy in Head and Neck Cancer Cell Lines. *Braz Dental J*. 2016;27(1):108-12.

63. Salmen S. Inhibitors of bacterial and mammalian hyaluronidase-Synthesis and structure-activity relationships [Doctoral Thesis]. Regensburg: University of Regensburg; 2003.
64. Ogston A, Stanier J. The physiological function of hyaluronic acid in synovial fluid; viscous, elastic and lubricant properties. *The Journal of Physiology*. 1953;119(2-3):244.
65. Price RD, Berry M, Navsaria HA. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *J Plas Reconstr Ae S*. 2007;60(10):1110-9.
66. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(7):528-39.
67. Ogrodowski CS. Produção de ácido hialurônico por *Streptococcus*: estudo da fermentação e caracterização do produto [Tese]. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP; 2006.
68. Botzki A. Structure-based design of hyaluronidase inhibitors [Doctoral Thesis]. Munchen: Universität Regensburg; 2004.
69. Petersen MTN, Klitgaard S, Skovsen E, Petersen SB, Tommerraas K, Abdellaoui KS. Biophysical properties of phenyl succinic acid derivatised hyaluronic acid. *J Fluoresc*. 2010;20(2):483-92.
70. Brown M, Jones SA. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J Eur Acad of Dermatol*. 2005;19(3):308-18.
71. Rydell N, Balazs EA. Effect of intra-articular injection of hyaluronic acid on the clinical symptoms of osteoarthritis and on granulation tissue formation. *Clin Orthop Relat R*. 1971;80:25-32.
72. Medeiros AC, Ramos AMO, Dantas Filho AM, Azevedo RdCF, Araújo FLFB. Tratamento tópico de queimaduras do dorso de ratos com ácido hialurônico. *Acta Cir Bras*. 1999;14(4):203-7.
73. Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet Med - US*. 2008;53(8):397-411.
74. Spickenreither M. Inhibitors of bacterial and mammalian hyaluronidases: design, synthesis and structure-activity relationships with focus on human enzymes [Doctoral Thesis]. Regensburg: University of Regensburg; 2007.
75. Juhlin L. Hyaluronan in skin. *J Inter Med*. 1997;242(1):61-6.

76. Rocquet C, Reynaud R. RenovHyal, a Patented Anti-Ageing Cosmetic Ingredient. *Cosm Sci Techn*. 2008;112-20.
77. Salles AG, Remigio A, Saito O, Camargo CP, Zacchi VB, Saito PL, et al. Avaliação da durabilidade de preenchimento de ácido hialurônico com ultra-som facial. *Arq Cat Med*. 2009;38(supl 1):281-3.
78. Girish K, Kemparaju K, Nagaraju S, Vishwanath B. Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective. *Curr Med Chem*. 2009;16(18):2261-88.
79. Starr CR, Engleberg NC. Role of hyaluronidase in subcutaneous spread and growth of group A *Streptococcus*. *Infect Immun*. 2006;74(1):40-8.
80. Simpson MA, Lokeshwar VB. Hyaluronan and hyaluronidase in genitourinary tumors. *Front Biosci*. 2008;13:5664.
81. Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T. Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1985;33(2):642.
82. Brogden R, Speight T, Avery G. Sodium cromoglycate (cromolyn sodium): a review of its mode of action, pharmacology, therapeutic efficacy and use. *Drugs*. 1974;7(3-4):164-282.
83. Botzki A, Rigden DJ, Braun S, Nukui M, Salmen S, Hoechstetter J, et al. L-Ascorbic Acid 6-Hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes. *J Biol Chem*. 2004;279(44):45990-7.
84. Girish KS, Kemparaju K. Inhibition of Naja naja venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70(8):948-52.
85. Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sci*. 2007;80(21):1921-43.
86. Kuppusamy U, Khoo H, Das N. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochem Pharmacol*. 1990;40(2):397.
87. Hertel W, Peschel G, Ozegowski JH, Müller PJ. Inhibitory effects of triterpenes and flavonoids on the enzymatic activity of hyaluronic acid-splitting enzymes. *Arch Pharm*. 2006;339(6):313-8.
88. Liu M, Yin H, Dong J, Xiao L, Liu G, Qian Z, et al. Inhibition and Interaction with Hyaluronidase by Compounds from Hop (*Humulus lupulus* L) Flowers. *Asian J Chem*. 2013;25(18):10262.

89. Akkol EK, Süntar I, İlhan M, Aras E. In vitro enzyme inhibitory effects of *Rubus sanctus* Schreber and its active metabolite as a function of wound healing activity. J of Herb Med. 2015;5(4):207-10.
90. Soberón JR, Sgariglia MA, Sampietro DA, Quiroga EN, Vattuone MA. Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodanthus acutifolius*. J Ethnopharmacol. 2010;130(2):329-33.
91. Bralley E, Greenspan P, Hargrove JL, Hartle DK. Inhibition of hyaluronidase activity by select Sorghum brans. J Med Food. 2008;11(2):307-12.
92. Sahasrabudhe A, Deodhar M. Anti-hyaluroiüdase, Anti-elastase Activity of *Garcinia indica*. Int J Bot. 2010;6:1-10.
93. Xu M, Zhu HT, Cheng RR, Wang D, Yang CR, Tanaka T, et al. Antioxidant and hyaluronidase inhibitory activities of diverse phenolics in *Phyllanthus emblica*. Nat Prod Res. 2016:1-4.
94. Ono M, Masuoka C, Tanaka T, Ito Y, Nohara T. Antioxidative and antihyaluronidase activities of some constituents from the aerial part of *Daucus carota*. Food Sci Technol Res. 2001;7(4):307-10.
95. Guginski G, Luiz AP, Silva MD, Massaro M, Martins DF, Chaves J, et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. Pharmacol Biochem Be. 2009;93(1):10-6.
96. Silva CAM. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart & Miq.) Baehni (Sapotaceae) [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2007.
97. Perfeito JP, Santos ML, López KSE, Paula JE, Silveira D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. Rev Bras Farmacog. 2005;15(1):183-6.
98. Lopez KSE. Estudo químico e atividades biológicas de *Pouteria torta* (Mart.) Ralck (Sapotaceae) [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2005.
99. Nunes MM. Atividade antiinflamatória do extrato etanólico de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk., Sapotaceae. [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2004.
100. Junior EAF. Investigação das possíveis atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Pouteria ramiflora* [Dissertação]. Belém Universidade Federal do Pará; 2004.
101. Facino RM, Carini M, Stefani R, Aldini G, Saibene L. Anti-elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and sapogenins from *Hedera helix*, *Aesculus*

hippocastanum, and *Ruscus aculeatus*: factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency. *Archiv der Pharmazie*. 1995;328(10):720-4.

102. Melo RO, Gama SM, Resck IS, Silveira D, editors. Fitoquímica do Extrato Etanólico de *Sapindus saponaria* (Sapindaceae). XIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Brasília e 4º Congresso de Iniciação Científica do DF 2007; Brasil: Universidade de Brasília.

103. Li Y, Yin H, Qian Z, Miao J, Huai Q. Anti-allergic and antioxidant effects of flavonoid glycosides isolated from Hop (*Humulus lupulus* L) flowers. *Asian J Chem*. 2014;26(10):3061.

104. Abdullah NH, Thomas NF, Sivasothy Y, Lee VS, Liew SY, Noorbatcha IA, et al. Hyaluronidase Inhibitory Activity of Pentacyclic Triterpenoids from *Prismatomeris tetrandra* (Roxb.) K. Schum: Isolation, Synthesis and QSAR Study. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2):143.

105. Wagner H, Bladt S, Rickl V. Plant drug analysis: a thin layer chromatography. . Berlin: Springer Verlag; 2009.

106. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem*. 2004;84(3):329-.

107. Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa C, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím Nova*. 2007;30(2):351-5.

108. Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicult Res*. 1998;37(2):99-105.

109. Buriol L, Finger D, Schmidt EM, Santos JMT, Rosa MR, Quináia SP, et al. Chemical composition and biological activity of oil propolis extract: an alternative to ethanolic extract. *Quím Nova*. 2009:296.

110. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*. 1999;269(2):337-41.

111. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnan JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp - a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Plant Med*. 1982;45(5):31-4.

112. Di Ferrante N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *J Biol Chem*. 1956;220(1):303-6.

113. Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T. Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their antiallergic actions. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1992;40(6):1439-42.
114. Samee H, Li ZX, Lin H, Khalid J, Guo YC. Anti-allergic effects of ethanol extracts from brown seaweeds. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2009;10(2):147-53.
115. Ippoushi K, Yamguchi Y, Itou H, Auma K, Higashio H. Evaluation of Inhibitory Effects of Vegetables and Herbs on Hyaluronidase and Identification of Rosmarinic Acid as a Hyaluronidase Inhibitor in *Lemon Balm (Melissa officinalis L.)*. *Food Sci Technol Res*. 2000;6(1):74-7.
116. Zhang Q, Zhao X, Qiu H. Flavones and flavonols: phytochemistry and biochemistry. *Natural Products: Springer*; 2013. p. 1821-47.
117. Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi M, Krishna D. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol*. 2001;33(1):2-16.
118. Tokeshi I, Yoshimoto T, Muto N, Nakamura S, Ashizawa K, Nakada T, et al. Antihyaluronidase action of ellagic acid effectively prevents polyspermy as a result of suppression of the acrosome reaction induced by sperm-zona interaction during in vitro fertilization of porcine oocytes. *J Reprod Develop*. 2007;53(4):755-64.
119. Monteiro JM, Albuquerque UP, Araujo EL, Amorim ELC. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quím Nova*. 2005;28(5):892-6.
120. Valente LM, Alves FF, Bezerra GM, Almeida MBS, Rosario SL, Mazzei JL, et al. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. *Rev Bras Farmacog*. 2006;16(2):216-23.
121. Pereira CAM. Estudo cromatográfico (HPLC, HPTLC, LC-MS) e análise microscópica das folhas de espécies de *Passiflora L* [Tese]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2002.
122. Moraes NA. Monitoramento sazonal da atividade antioxidante das folhas de *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil.: correlação com o teor de hiperosídeo e isoquercitrina [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2016.
123. Chávez JP, Santos ID, Cruz FG, David JM. Flavonoids and triterpene ester derivatives from *Erythroxylum leal costae*. *Phytochemistry*. 1996;41(3):941-3.
124. Johnson EL, Schmidt WF. Flavonoids as chemotaxonomic markers for *Erythroxylum australe*. *Z Naturforsch C A J Biosci*. 2004;59:769-76.

125. Johnson EL, Schmidt WF, Norman HA. Flavonoids as markers for *Erythroxylum* Taxa: *E. coca* var. *ipadu* and *E. novogranatense* var. *truxillense*. *Biochem Syst Ecol.* 1998;26(7):743-59.
126. Fonseca APND, Silva GDF, Carvalho JJ, Salazar GDCM, Duarte LP, Silva RP, et al. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. *Quím Nova.* 2007;30(4).
127. Nhiem NX, Van Kiem P, Van Minh C, Ban NK, Cuong NX, Tai BH, et al. Phenylpropanoid glycosides from *Heterosmilax erythrantha* and their antioxidant activity. *Arch Pharm Res.* 2009;32(10):1373-7.
128. Lee JH, Ku CH, Baek N, Kim SH, Park HW, Kim DK. Phytochemical constituents from *Diodia teres*. *Arch Pharm Res.* 2004;27(1):40-3.
129. Monteiro MC, Trugo LC. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quím Nova.* 2005;28(4):637.
130. Maria CAB, Moreira RFA. Métodos para análise de ácido clorogênico. *Quím Nova.* 2004;27(4):586-92.
131. Oliveira DM, Bastos DHM. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quím Nova.* 2011;34(6):1051-6.
132. Machado H. Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Ehrlich in vivo [Dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2006.
133. Muri EMF, Sposito MMM, Metsavaht L. Farmacologia de drogas vasoativas. *Acta Fisiátrica.* 2010;17(1).
134. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Sci World J.* 2013;2013.
135. Tatemoto H, Tokeshi I, Nakamura S, Muto N, Nakada T. Inhibition of boar sperm hyaluronidase activity by tannic acid reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Zygote.* 2006;14(04):275-85.
136. Li MW, Yudin AI, VandeVoort CA, Sabeur K, Primakoff P, Overstreet JW. Inhibition of monkey sperm hyaluronidase activity and heterologous cumulus penetration by flavonoids. *Biol Reprod.* 1997;56(6):1383-9.
137. Kim MY, Kim YC, Chung SK. Identification and in vitro biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot: inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals. *J Sci Food Agri.* 2005;85(4):633-40.

138. Liu Z, Tao X, Zhang C, Lu Y, Wei D. Protective effects of hyperoside (quercetin-3-o-galactoside) to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide. *Biomed Pharmacother.* 2005;59(9):481-90.
139. Kim SJ, Um JY, Hong SH, Lee JY. Anti-inflammatory activity of hyperoside through the suppression of nuclear factor-KB activation in mouse peritoneal macrophages. *Am J Chinese Med.* 2011;39(01):171-81.
140. Süntar IP, Akkol EK, Yilmazer D, Baykal T, Kırmızıbekmez H, Alper M, et al. Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol.* 2010;127(2):468-77.
141. Nogueira M. Estudo químico de *Mucuna aterrima* e da sua atividade nematocida sobre o fitonematóide *Meloidogyne incognita* raça 3 [Dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1994.
142. Silverstein RM. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora SA; 2000. 460 p.
143. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Ann Rev of Nutr.* 2001;21(1):381-406.
144. Han X, Shen T, Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci.* 2007;8(9):950-88.
145. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nut Rev.* 1998;56(11):317-33.
146. Ferreira A, Matsubara L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Méd Bras.* 1997;43(1):61-8.
147. Dasgupta N, De B. Antioxidant activity of *Piper betle* L. leaf extract in vitro. *Food Chem.* 2004;88(2):219-24.
148. Velioglu Y, Mazza G, Gao L, Oomah B. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agr Food Chem.* 1998;46(10):4113-7.
149. Evans CAR, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med.* 1996;20(7):933-56.
150. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63(7):1035-42.
151. Azuma K, Nakayama M, Koshioka M, Ippoushi K, Yamaguchi Y, Kohata K, et al. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J of Agric and Food Chem.* 1999;47(10):3963-6.

152. Ahn MR, Kunimasa K, Kumazawa S, Nakayama T, Kaji K, Uto Y, et al. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(5):643-51.
153. Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Int Pharm Sci*. 2011;1(1):25-41.
154. Ohshima H, Yoshie Y, Auriol S, Gilibert I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radical Bio Med*. 1998;25(9):1057-65.
155. Subhadra S, Kanacharalapalli V, Ravindran V, Parre S, Chintala S, Thatipally R. Comparative toxicity assessment of three *Tephrosia species* on *Artemia salina* and animal cell lines. *J Nat Pharm*. 2011;2(3):143.
156. Carballo J, Hernández-Iñda Z, Pérez P, García-Grávalos M. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*. 2002;2(1):17.
157. Salinas GMM, Fernández SS. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacologyonline*. 2006;3:633-8.